

Protocolo de extração de DNA de amostras conservadas em TriZol[®]

(LAB. PROTOZOLOGIA – IMT – FMUSP)

1. Pré-ajustar a microcentrífuga refrigerada para que se obtenha a temperatura de 4°C.
2. Transferir toda a solução conservante para um tubo de 1.5mL, tomando o cuidado de não transferir pedaços do órgão ou o pellet de células.
3. Adicionar 0.2mL de clorofórmio para cada 1mL de TriZOL[®] que foi transferido para o tubo. Vortexar vigorosamente até obter uma solução rósea de aspecto leitoso.
4. Centrifugar a 13.000 x g a 4°C por 15 minutos.
5. Observar as 3 fases da solução: a primeira, aquosa, contém o RNA; a interfase branca e leitosa contém principalmente DNA e a fase inferior rósea contém predominantemente proteínas. Descartar a fase aquosa superior.
6. Adicionar 0.3 mL de etanol absoluto para cada 1mL de TriZOL[®] utilizado inicialmente e homogeneizar por inversão.
7. Incubar à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugar por 1900 x g por 5 minutos a 4°C.
8. Remover o sobrenadante. Lavar o pellet resultante com uma solução 0.1 M de citrato de sódio em etanol 10% na proporção 1mL de solução para cada 1mL de TriZOL[®] utilizado inicialmente.
9. Incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, com agitação por vórtex a cada 10 minutos.
10. Centrifugar a 2000 x g por 5 minutos a 4°C.
11. Repetir passos 8 a 10 mais uma vez. Para pellets grandes, uma Segunda lavagem pode ser necessária.
12. Suspender o pellet em etanol 75% na proporção 2mL de etanol para cada 1mL de TriZOL[®] utilizado inicialmente. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente, com agitação por vórtex a cada 5 minutos. Centrifugar a 2000 x g por 5 minutos a 4°C.
13. Descartar cuidadosamente o sobrenadante e secar os tubos invertidos em fluxo laminar sobre papel filtro por 2 a 10 minutos, dependendo da quantidade material extraído. Ressuspender o pellet numa solução de NaOH 8mM, na proporção de 450µL de solução para cada 10⁷ células ou 60mg de tecido. O pH da solução é aproximadamente 9. No caso de se precisar ajustar o pH, o ajuste deve ser feito com tampão TE (Tris-EDTA) ou HEPES.
14. Após este estágio, a suspensão pode ainda conter *debris* celular. Para removê-lo, centrifugar o tubo a 13000 x g por 10 minutos. O sobrenadante contém o DNA e deve ser transferido a outro tubo. Estocar a -70°C até o momento de uso.